



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniera en Alimentos.

Título del Proyecto de Investigación:

“ELABORACIÓN DE QUESO CREMA CON BACTERIAS LÁCTICAS
PROVENIENTES DEL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) FINO DE
AROMA”.

Autora:

Thalía Yanina Mendoza García

Director de Proyecto de Investigación:

Ing. Christian Amable Vallejo Torres, M.Sc.

Mocache - Los Ríos – Ecuador

2017



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **THALÍA YANINA MENDOZA GARCÍA**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

THALÍA YANINA MENDOZA GARCÍA

CI. 130951561-5



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Ing. Christian Vallejo Torres, M.Sc., docente de la Facultad de Ciencia Pecuarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

CERTIFICO: Que la señorita **Thalía Yanina Mendoza García**, realizó el Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos titulado: **“ELABORACIÓN DE QUESO CREMA CON BACTERIAS LÁCTICAS PROVENIENTES DEL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) FINO DE AROMA”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Christian Vallejo Torres, M.Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Ing. Christian Vallejo Torres, M.Sc., en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado: **“ELABORACIÓN DE QUESO CREMA CON BACTERIAS LÁCTICAS PROVENIENTES DEL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) FINO DE AROMA”**, me permito manifestarle a usted y por medio del Consejo Académico lo siguiente:

Que, la señorita **Thalía Yanina Mendoza García**, egresada de la Facultad de Ciencias Pecuarias, ha cumplido con las correcciones pertinentes, de acuerdo al Reglamento de Graduación de Pregrado de la UTEQ, he ingresado el Proyecto de Investigación al sistema URKUND, tengo bien certificar la siguiente información sobre el informe del sistema reflejando un porcentaje del ____2%__

Ing. Christian Vallejo Torres, M.Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“ELABORACIÓN DE QUESO CREMA CON BACTERIAS LÁCTICAS
PROVENIENTES DEL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) FINO DE
AROMA”.**

**Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título
de Ingeniera en Alimentos.**

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. German Jácome M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Gregorio Vásquez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Orly Cevallos

AGRADECIMIENTO.

Expreso un grande y eterno agradecimiento a mi Dios y Señor Jesucristo, por su amor incondicional, la fuerza, la salud y la sabiduría que me brinda día a día, por haberme guiado y guardado a lo largo de esta carrera.

A mis padres Teddy y Yanina por el sacrificio que han realizado desde siempre para que yo pueda ser una profesional, su paciencia, sus consejos, disciplinas y especialmente sus oraciones en todo momento.

A mis hermanas Tiffany y Tatiana por la paciencia, ayuda y compañía en los momentos que las necesite.

A mi Director de tesis, Ing. Christian Vallejo Torres, por la ayuda brindada, las enseñanzas y la orientación, su paciencia y apoyo en la presente investigación como a lo largo de la carrera.

A esos seres excepcionales que conocí en el trayecto de esta investigación como la Ing. Ketty Cobeña, el Dr. Orly Cevallos y a mis compañeras Lisseth y Diana, muchas, muchas gracias por todo, su ayuda fue fundamental, a mis compañeros, especialmente a mis amigas Karla, Carolina y Lupita y demás personas como docentes y hermanos en la fe, que dispusieron de su tiempo para ayudarme, no solo en el proceso de este trabajo sino durante mi vida universitaria, GRACIAS!. Dios les recompensara en gran manera.

Con Dios está la sabiduría y el poder; Suyo es el consejo y la inteligencia.

Job 12:13

DEDICATORIA.

Este trabajo realizado con mucho sacrificio y paciencia va dedicado con todo mi amor y gratitud, especialmente a la mujer que me dio la vida mi mamita Nolfá sin ella esto no fuera posible.

A mi papi, con mucho cariño, porque sé que mis triunfos son los de él.

A mis hermanas que sé, que también alcanzaran muchas metas.

He peleado la buena batalla, he acabado la carrera, he guardado la fe.

2 Timoteo 3:7

Thalía Mendoza García

RESUMEN.

En este trabajo se elaboró queso crema fermentado en diferentes temperaturas (30, 35, 40 y 45 °C) con bacterias ácido lácticas (*Lactococcus spp.*), provenientes del mucílago de cacao fino de aroma, para la obtención de las bacterias ácido lácticas (BAL) se fermentó por 48 horas el mucílago, luego fue sembrado en un medio de cultivo MRS, sucesivamente las bacterias fueron agregadas a la leche para la posterior fermentación y producción de queso crema, se aplicó un diseño estadístico completamente al azar, con cuatro factores y cuatro repeticiones siendo las temperaturas de fermentación los tratamientos, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey al 5 % de probabilidad, como resultado se obtuvo los quesos crema correspondientes a las temperaturas de 30, 35 y 40 °C, en la temperatura de 45 °C, no sobrevivieron las bacterias, por lo tanto, no se obtuvo queso crema. Se realizaron análisis a los quesos crema, bromatológicos (humedad, cenizas, proteínas, grasa y pH), análisis microbiológicos para determinar la presencia de *E. Coli* y *Salmonella*, también se evaluaron las características organolépticas (acidez, sabor, textura y olor). De acuerdo al análisis estadístico realizado se determinó que no existió diferencia estadística entre los tratamientos en las variables bromatológicas de cenizas y grasa, al contrario de la humedad, proteínas y pH, respecto a la evaluación organoléptica, existió diferencias entre los tratamientos en todas las variables analizadas, cabe indicar que dentro del análisis microbiológico, se determinó que no hubo presencia de bacterias Gram negativas, de tal manera que se cumplió con los requerimientos señalados por la NTE INEN 1528: 2012. Se concluyó que el tratamiento tres (40 °C de fermentación) sobresalió favorablemente, en las características bromatológicas en comparación de los demás tratamientos, con un pH de 4,53, contenido proteico de 10,92% y una humedad de 71,80%. De igual manera en las variables organolépticas se demostró que el T3 fue valorado como agradable con una calificación de 4 puntos, dentro de la escala de 5. Por último, se realizó un balance de masa y se determinó el rendimiento final del queso crema con un 13,23%.

Palabras claves: Mucílago, cacao, bacterias lácticas, fermentación, temperatura.

ABSTRACT.

In this work, cream cheese fermented at different temperatures (30, 35, 40 and 45 ° C) with lactic acid bacteria (*Lactococcus spp.*) From the fine-grit cocoa mucilage was elaborated to obtain the LAB. 48 hours the mucilage, then was seeded in a culture medium MRS, successively bacteria were added to the milk for the subsequent fermentation and cream cheese production, a completely randomized design was applied with four factors and four replicates being the Temperatures of fermentation treatments, Tukey's multiple range test was used at 5% probability, resulting in cream cheese corresponding to temperatures of 30, 35 and 40 ° C, at the temperature of 45 ° C, no The bacteria survived, therefore, no cream cheese was obtained. Analyzes were carried out on cream, bromatological cheeses (humidity, ash, protein, fat and pH), microbiological analysis to determine the presence of *E. coli* and *Salmonella*, organoleptic characteristics (acidity, taste, texture and odor) were also evaluated. According to the statistical analysis, it was determined that there was no statistical difference between the treatments in the bromatological variables of ash and fat, as opposed to humidity, proteins and pH, regarding the organoleptic evaluation, there were differences between treatments in all variables Analyzed, it is possible to indicate that within the microbiological analysis, it was determined that there was no presence of Gram negative bacteria, in such a way that it met the requirements indicated by the NTE INEN 1528: 2012. It was concluded that the treatment three (40 °C fermentation) Was favorable in the bromatological characteristics compared to the other treatments, with a pH of 4.53, protein content of 10.92% and humidity of 71.80%. Likewise in the organoleptic variables it was shown that the T3 was assessed as pleasant with a score of 4 points, within the scale of 5. Finally, a mass balance was performed and the final yield of the cream cheese was determined with a 13.23%.

Key words: Mucilage, cocoa, lactic acid bacteria, fermentation, temperature.

Tabla de contenido

Contenido	Página
PORTADA	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
PROYECTO DE APROVACIÓN DE MIEMBROS DE TRIBUNAL	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CÓDIGO DUBLÍN	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Problema de investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.	4
1.1.2. Formulación del problema.....	5
1.1.3. Sistematización del problema.....	5
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1 Objetivo general.	5
1.2.2. Objetivos específicos.....	5
1.3. Justificación.....	6
CAPÍTULO II.....	7
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	7
2.1. Marco conceptual.	8
2.1. Marco referencial.....	10
2.1.1. La leche.....	10
2.2.2. Requerimientos de los quesos frescos según la norma INEN-1528.....	12
2.2.3. Requisitos para quesos crema en México.....	14
2.2.4. Bacterias lácticas.	15
2.2.5. El cacao.....	16
2.2.6. Mucilago de cacao.	16
CAPÍTULO III	18

MÉTODOLÓGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	18
3.1. Localización.....	19
3.1.1. Condiciones meteorológicas.....	19
3.2. Tipos de investigación.....	19
3.3. Métodos de investigación.....	20
3.4. Fuentes de recopilación de la investigación.....	20
3.5. Diseño de la investigación.....	21
3.6. Esquema del ANDEVA.....	21
3.6.1. Modelo matemático.....	22
3.6.2. Esquema del experimento.....	22
3.7. Instrumentos de la investigación.....	23
3.7.1. Variables bromatológicas evaluadas.....	23
3.7.2. Variables organolépticas evaluadas.....	23
3.7.3. Análisis microbiológicas evaluadas.....	23
3.7.4. Procedimiento experimental.....	24
3.7.4.1. Recolección del mucílago de cacao.....	24
3.7.4.2. Preparación de medio de cultivo MRS.....	24
3.7.4.3. Preparación del agua peptona.....	25
3.7.4.4. Obtención de cepas de <i>Lactococcus spp.</i>	25
3.7.5. Elaboración de queso crema.....	25
3.7.6. Diagrama de bloques para la obtención de queso crema.....	26
3.8. Tratamiento de los datos.....	27
3.9. Recursos humanos y materiales.....	27
3.9.1. Materia prima.....	28
3.9.2. Insumos.....	28
3.9.3. Equipos.....	28
3.9.4. Materiales de laboratorio.....	29
3.9.5. Reactivos.....	29
3.9.6. Materiales de oficina.....	30
CAPÍTULO IV.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. Resultados y discusión.....	32
4.1.1. Análisis bromatológicos de los quesos crema.....	32
4.1.1.1. Resultados de la variable humedad.....	33
4.1.1.2. Resultados de la variable ceniza.....	34

4.1.1.3. Resultados de la variable proteína.	35
4.1.1.4. Resultados de la variable grasa.	37
4.1.1.5. Resultados de la variable pH.	38
4.1.2. Análisis microbiológico de los quesos crema.	39
4.1.3. Análisis organolépticos de los quesos crema.	40
4.1.3.1. Resultado de la variable acidez.	41
4.1.3.2. Resultado de la variable sabor.	42
4.1.3.3. Resultado de la variable olor.	43
4.1.3.4. Resultado de la variable textura.	44
CAPÍTULO V	45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
5.1. Conclusiones.	46
5.2. Recomendaciones.	46
CAPÍTULO VI	47
BIBLIOGRAFÍA	47
6.1. Literatura citada.	48
CAPÍTULO VII	51
ANEXOS	51

Índice de tablas

Tabla	Página
1. Composición del queso crema.....	11
2. Requisitos físico químicos para quesos frescos no madurados.	12
3. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.....	13
4. Requisitos bromatológicos para quesos de untar.....	14
5. Composición química de la pulpa de cacao.	17
6. Condiciones meteorológicas aproximadas del cantón Mocache.	19
7. Esquema del ANDEVA.....	21
8. Esquema del experimento con los tratamientos.	22
9. Descripción de los tratamientos en estudio.	27
10. Promedios de los análisis bromatológicos realizados a los quesos crema.	32
11. Resultados del conteo microbiológicos realizados a los quesos crema.....	39
12. Promedios de los análisis organolépticos realizados a los quesos crema.....	41

Índice de figuras

Figura	Página
1. Diagrama de bloques del proceso para la obtención de queso crema con BAL provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	26
2. Promedios de humedad de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	33
3. Promedios de ceniza de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	34
4. Promedios de proteínas de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	35
5. Promedios de grasa de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	37
6. Promedios de pH de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	38
7. Promedios de acidez sensorial de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	41
8. Promedios del sabor de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	42
9. Promedios del olor de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	43
10. Promedios de la textura de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.	44

Índice de anexos

Anexo	Página
1. ANDEVA de los análisis bromatológicos	52
2. ANDEVA de los análisis organolépticos: acidez, sabor, textura y olor.....	53
3. Técnica de determinación de proteína bruta.....	54
4. Técnica de determinación de humedad o pérdida por calentamiento.....	55
5. Técnica de determinación de grasa en quesos.....	55
6. Técnica de determinación de cenizas o materia inorgánica.	56
7. Análisis sensorial afectivo cuantitativo del queso crema.	57
8. Fotos del experimento.	58
9. Balance de masa y humedad del queso crema.....	63

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“ELABORACIÓN DE QUESO CREMA CON BACTERIAS LÁCTICAS PROVENIENTES DEL MUCÍLAGO DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) FINO DE AROMA”.
Autor:	Thalía Yanina Mendoza García
Palabras clave:	Mucílago, cacao, bacterias lácticas, fermentación, temperatura.
Editorial:	Quevedo. UTEQ, 2017.
Resumen:	En este trabajo se elaboró queso crema fermentado en diferentes temperaturas (30, 35, 40 y 45 °C) con bacterias ácido lácticas (<i>Lactococcus spp.</i>), provenientes del mucílago de cacao fino de aroma, para la obtención de las bacterias ácido lácticas (BAL) se fermento por 48 horas el mucílago, luego fue sembrado en un medio de cultivo MRS, sucesivamente las bacterias fueron agregadas a la leche para la posterior fermentación y producción de queso crema, se aplicó un diseño estadístico completamente al azar, con cuatro factores y cuatro repeticiones siendo las temperaturas de fermentación los tratamientos, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey al 5 % de probabilidad, como resultado se obtuvo los quesos crema correspondientes a las temperaturas de 30, 35 y 40 °C, en la temperatura de 45 °C, no sobrevivieron las bacterias, por lo tanto, no se obtuvo queso crema. Se realizaron análisis a los quesos crema, bromatológicos (humedad, cenizas, proteínas, grasa y pH), análisis microbiológicos para determinar la presencia de <i>E. Coli</i> y <i>Salmonella</i>, también se evaluaron las características organolépticas (acidez, sabor, textura y olor). De acuerdo al análisis estadístico realizado se determinó que no existió diferencia estadística entre los tratamientos en las variables bromatológicas de cenizas y grasa, al contrario de la humedad, proteínas y pH, respecto a la evaluación organoléptica, existió diferencias entre los tratamientos en todas las variables analizadas, cabe indicar que dentro del análisis microbiológico, se determinó que no hubo presencia de bacterias Gram negativas, de tal

manera que se cumplió con los requerimientos señalados por la NTE INEN 1528: 2012. Se concluyó que el tratamiento tres (40 °C de fermentación) sobresalió favorablemente, en las características bromatológicas en comparación de los demás tratamientos, con un pH de 4,53, contenido proteico de 10,92% y una humedad de 71,80%. De igual manera en las variables organolépticas se demostró que el T3 fue valorado como agradable con una calificación de 4 puntos, dentro de la escala de 5. Por último, se realizó un balance de masa y se determinó el rendimiento final del queso crema con un 13,23%.

In this work, cream cheese fermented at different temperatures (30, 35, 40 and 45 ° C) with lactic acid bacteria (*Lactococcus spp.*) From the fine-grit cocoa mucilage was elaborated to obtain the LAB. 48 hours the mucilage, then was seeded in a culture medium MRS, successively bacteria were added to the milk for the subsequent fermentation and cream cheese production, a completely randomized design was applied with four factors and four replicates being the Temperatures of fermentation treatments, Tukey's multiple range test was used at 5% probability, resulting in cream cheese corresponding to temperatures of 30, 35 and 40 ° C, at the temperature of 45 ° C, no The bacteria survived, therefore, no cream cheese was obtained. Analyzes were carried out on cream, bromatological cheeses (humidity, ash, protein, fat and pH), microbiological analysis to determine the presence of *E. coli* and *Salmonella*, organoleptic characteristics (acidity, taste, texture and odor) were also evaluated. According to the statistical analysis, it was determined that there was no statistical difference between the treatments in the bromatological variables of ash and fat, as opposed to humidity, proteins and pH, regarding the organoleptic evaluation, there were differences between treatments in all variables Analyzed, it is possible to indicate that within the microbiological analysis, it was determined that there was no presence of Gram negative bacteria, in such a way that it met the requirements indicated by the NTE INEN 1528: 2012. It was

	concluded that the treatment three (40 °C fermentation) Was favorable in the bromatological characteristics compared to the other treatments, with a pH of 4.53, protein content of 10.92% and humidity of 71.80%. Likewise in the organoleptic variables it was shown that the T3 was assessed as pleasant with a score of 4 points, within the scale of 5. Finally, a mass balance was performed and the final yield of the cream cheese was determined with a 13.23%. Key words: Mucilage, cocoa, lactic acid bacteria, fermentation, temperature.
Descripción:	82 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM.
URL.:	

Introducción.

Dentro de la clasificación de los quesos, se encuentran el queso crema de textura suave coagulada, no granulada y cremosa, de sabor ácido debido a la presencia de bacterias ácido lácticas Gram positivas como las del género *Lactococcus* y *Leuconostoc*, las cuales producen ácido láctico, además brindan un olor característico al producto. Este derivado lácteo es muy popular en América del Norte, usualmente utilizado para untar en panecillos, aderezo para ensaladas, también es empleado como un ingrediente para la elaboración de postres y tartas (1).

En Ecuador la cantidad de empresas dedicadas a la elaboración de queso crema, es mínima, comparada a las que se ofrecen queso fresco, ya que en el país ocho de cada diez ecuatorianos dicen que prefieren comprar queso fresco, le sigue en preferencia el mozzarella, queso crema, maduro, semi maduro; sin embargo, la marca más reconocida de queso crema en el país es la industria Láctea Toni S.A. (2; 3).

Actualmente las bacterias ácido lácticas (BAL), son conocidas por su principal participación en la elaboración de quesos, ya que estas además de brindar beneficios a la salud del consumidor, ofrecen características de sabor acidulado, asimismo, las bacterias lácticas son empleadas por las industrias alimenticias en la elaboración del yogurt, vino, encurtir carnes, embutidos y pescados (4).

Las BAL se pueden obtener de diferentes fuentes microbianas, como es el caso de la primera fase de fermentación anaeróbica del cacao, es decir, en las primeras 48 horas, la pulpa blanca denominada mucílago sufre un proceso de contaminación sucesiva de microorganismos, luego de la fermentación por levaduras, se instalan las bacterias lácticas y acéticas (4; 5); específicamente las BAL del género *Lactococcus spp* donde comienzan su incremento hasta después de 24 horas obteniendo su máximo crecimiento a las 48 horas (6), población elevada de bacterias ácido lácticas que se empleó en la elaboración de queso crema, aprovechando esta actividad para conseguir un producto mejorado con una acidez ideal y un sabor característico, que brinde soluciones prácticas a la industria.

Para el desarrollo de la investigación se fermentó el mucílago de cacao fino de aroma en un periodo de tiempo de 48 horas, donde se posesionan las bacterias ácido lácticas

Lactococcus spp, posteriormente se tomaron 10 mL y se sembró en un medio de cultivo man rogosa y sharpe (MRS), donde se tomaron 20 cepas de bacterias y se disolvieron en 5 mL de leche, los cuales se mezclaron en tarrinas estériles con 500 mL de leche pasteurizada con una temperatura de 30 °C, para una posterior incubación de 24 horas se colocaron en 3 baños maría a temperaturas de 35, 40 y 45 °C, otro se puso a temperatura ambiente la cual esta aproximadamente en 30 °C, para obtener 4 quesos crema incubados a diferentes temperaturas, se evaluaron las características físico-químicas, las características organolépticas y se conoció cuál de los diferentes presento mayor aceptación, se determinó la carga microbiológica y se verifico si están dentro de los parámetros establecidos por la norma INEN 1528.

Lo que busca la investigación es aprovechar el mucílago de cacao como fuente de BAL para la elaboración de queso crema, valorando su contenido de bacterias *Lactococcus spp*, dando como resultado un producto menos costoso, que sea aceptable por la población en general y que favorezca también los consumidores de escaso recursos, finalmente se desarrolló una tecnología adecuada para la elaboración de queso crema usando bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

El mucílago de cacao es una importante fuente de bacterias lácticas, con limitado aprovechamiento de su actividad microbiológica, dado las escasas investigaciones como lacto insumos para agregar valor, eso hace que muchos productores de cacao rechacen esa materia prima. El mucílago puede ser usado como una alternativa para obtener bacterias ácido lácticas, considerando que el procedimiento de obtención de dichas bacterias es simple, eso tornaría la elaboración de queso crema menos costosa que el producto convencional, lo que daría una oportunidad a la población de escasos recursos a consumir de este producto.

Diagnóstico.

En la fermentación del cacao se puede aprovechar cantidades considerables de mucílago, materia prima que no es aprovechada por el desconocimiento, lo que ocasiona pérdidas a los productores del país, ya que, dándole valor agregado, este mucílago podría aumentar las economías de los productores.

Pronóstico.

El queso crema es un producto consumido de manera considerable en el país ya que presenta importantes características nutricionales debido a la presencia de microorganismos probióticos. Sin embargo, el proceso de obtención de queso crema es costoso por la dificultad de obtener bacterias ácido lácticas. Esas bacterias pueden ser obtenidas desde el mucílago de cacao, lo que daría una valoración importante al mucílago, tornaría el proceso menos costoso del queso crema. Considerando dichas propiedades, investigó si las bacterias lácticas del género *Lactococcus spp*, provenientes del cacao podrán ser utilizadas para la elaboración de queso crema.

1.1.2. Formulación del problema.

El queso crema elaborado a partir de bacterias lácticas obtenidas del mucílago de cacao, es un producto que no se encuentra en el mercado, lo que conlleva a una valoración de la materia prima (mucílago) y así, obtener un producto de menor precio, comprado al ya existente en el mercado y con mejores expectativas funcionales y sensoriales.

1.1.3. Sistematización del problema.

Para la utilización del mucílago del cacao, se debe valorar la presencia de bacterias lácticas, que son las principales autoras de la transformación de la leche en queso crema, mediante el proceso de fermentación, potenciando el sabor y la acidez, y una textura cremosa, obteniendo un producto aceptable por los consumidores.

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

Elaborar queso crema adicionando bacterias lácticas provenientes del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino de aroma.

1.2.2. Objetivos Específicos.

1. Evaluar el efecto de las temperaturas (30, 35, 40 y 45 °C) de fermentación con bacterias lácticas (*Lactococcus spp.*) provenientes del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.), para obtener queso crema.
2. Determinar las características bromatológicas de los quesos crema, incubados a diferentes temperaturas.

3. Realizar un análisis microbiológico para determinar la presencia de *E. Coli* y *Salmonella*, en el queso crema fermentado, en diferentes temperaturas, con bacterias lácticas provenientes del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.).
4. Analizar las características organolépticas de los quesos crema compuestos de bacterias lácticas de mucílago de cacao, usando el modelo presentado en el Anexo 7.

1.3. Justificación.

El actual proyecto de investigación, brindará valiosa información acerca de los productos probióticos y las bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp*, no valoradas, presentes en el mucílago del cacao, microorganismos beneficiosos para la salud humana, que podrían ser utilizadas en la elaboración de queso crema, potenciando su acidez y sabor característico del producto, además de brindar soluciones prácticas a la industria como los bajos costos de producción. De manera que genere ganancias económicas y mitigue el impacto ambiental.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

– La leche.

Es un líquido completo y complejo porque cuenta con sustancias orgánicas e inorgánicas, obtenido de los ordeños diarios, completos, higiénicos e interrumpidos, a través de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas y es utilizado como alimento para sus crías (7; 8).

– El queso.

Se define por queso el producto derivado lácteo, blando semi duro que puede ser madurado o no madurado, por la agregación de un cuajo u otras sustancias coagulante, responsables de la coagulación de la proteína (caseína) de la leche, la cual puede estar compuesta por varios porcentajes de grasa (9).

– Queso crema.

Es un producto de textura suave coagulada, no granulada y cremosa, de sabor ácido debido a la presencia de bacterias ácido lácticas Gram positivas como las del género *Lactococcus* y *Leuconostoc*, las cuales producen ácido láctico, además brindan un olor característico al producto (1).

– Bacterias lácticas.

Las BAL son las productoras de ácido láctico y responsables de la fermentación de carbohidratos, al mismo tiempo son microorganismos bacilos Gram positivos (10; 11).

– Probióticos.

Son microorganismos como las levaduras y las bacterias entre ellas las BAL, considerados beneficiosos para la salud humana, consumidos en cantidades adecuadas, y brindan ventajas como la reconstrucción de la microflora intestinal, reducción del colesterol en la sangre, mejora la absorción de calcio y estimula el sistema inmunológico, etc. (11; 12).

– **Mucílago de cacao.**

Es una sustancia orgánica viscosa que cubre la almendra del cacao y se forma dentro de la mazorca, durante el crecimiento de la planta, es de color blanco, aromática, rica en azúcares, sabor tropical y suficientemente ácida, condiciones excelentes para el abundante desarrollo de microorganismos, durante la fermentación por levaduras, sucesivamente las bacterias lácticas fermentan los azúcares produciendo ácido láctico, acético y manitol (13; 14).

– **Fermentación.**

Se llama así al proceso donde los microorganismos utilizan la energía positiva que se acumula luego de varios cambios bioquímicos que sufren las sustancias orgánicas, la cual es utilizada para el desarrollo de su metabolismo (15).

2.1. Marco referencial.

2.1.1. La leche.

La leche es un alimento importante en la dieta de los humanos y básico de consumo, denominándose así un producto de primera necesidad, conocido por sus características nutricionales rico en energía, grasa, calcio, proteína, fosforo y varias vitaminas, tales características contribuyen satisfactoriamente a los requerimientos de la población en general (7; 8).

La leche y sus derivados también son incluidos en la dieta humana como es el caso del queso, manjar, kumis, leche en polvo, yogurt entre otros. Dentro de la clasificación de los quesos, se encuentran el queso crema de textura suave y cremosa, este producto ha sido muy popular en América del Norte, utilizado para untar en panecillos, aderezo para ensaladas, también es empleado como un ingrediente para la elaboración de postres y tartas por su contenido nutricional al igual que la leche, porque contiene los mismos componentes, incluso varios en porcentajes más elevados como es el caso del calcio y el fosforo, a excepción de la lactosa (11; 1; 16).

Por lo general la vida de anaquel del queso crema es aproximadamente un mes a una temperatura menor de 8 °C, en su elaboración se añaden agentes acidificantes o bacterias ácido lácticas las cuales brindan al queso crema un sabor y olor característico al producto y son las responsables de coagular la caseína de la leche produciendo la separación del suero con el queso crema, la leche que se utiliza debe ser pasteurizada, sin conservantes que afecten el proceso de fermentación ni estar adulterada, y respecto al contenido de grasa, esta puede ser entera, descremada o semidescremada, dentro de la elaboración no se aplica el madurado, la sal a utilizarse debe ser refinada para una mejor homogenización y de consumo humano, especies o saborizantes que potencien el sabor están permitidos dentro del proceso. Su empaque es en tarros de poliestireno (2) .

Tabla 1. *Composición del queso crema.*

Componente	Valor
Agua	53,75%
Energía	349,00 Kcal.
Proteína	7,55 g
Grasa	34,87 g
Carbohidratos	2,66 g
Fibra total	0,00 g
Ceniza	1,17 g
Calcio	80,00 mg
Fósforo	104,00 mg
Hierro	1,20 mg
Tiamina	0,02 mg
Riboflavina	0,20 mg
Niacina	0,10 mg
Vitamina C	0,00 mg
Vit. A equiv. Retinol	366,00 mcg
Ác. grasos monoinsat.	9,84 g
Ác. grasos poli-insat.	1,26 g
Ác. grasos saturados	21,97 g
Colesterol	110,00 mg
Potasio	119,00 mg
Sodio	296,00 mg
Zinc	0,54 mg
Magnesio	6,00 mg
Vitamina B6	0,05 mg
Vitamina B12	0,42 mcg
Ácido fólico	0,00 mcg
Folato equiv. FD	13,00 mcg
Fracción comestible	1,00%

Fuente: Los alimentos y sus nutrientes. Tablas de valor nutritivo de alimentos (17).

2.2.2. Requerimientos de los quesos frescos según la norma INEN-1528.

Requisitos específicos.

- Para la elaboración de los quesos frescos no madurados, se pueden emplear las siguientes materias primas e ingredientes autorizados, los cuales deben cumplir con las demás normas relacionadas o en su ausencia, con las normas del Codex Alimentarius:
- Leche y/o productos obtenidos de la leche (18).

Ingredientes tales como:

- a) Cultivos de fermentos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico y/o aromas y cultivos de otros microorganismos inocuos;
 - b) Cuajo u otras enzimas coagulantes inocuas e idóneas;
 - c) Cloruro de sodio;
 - d) Vinagre;
- Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con lo establecido en la Tabla 2 (18).

Tabla 2. *Requisitos físico químicos para quesos frescos no madurados.*

Tipo o clase	Humedad máxima (%)	Contenido de grasa en extracto seco, mínimo (% m/m)
	NTE INEN 63	NTE INEN 64
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Entero ó graso	-	45
Semidescremado o bajo en Grasa	-	20
Descremado ó magro	-	0,1

NTE INEN: Norma Técnica Ecuatoriana del Instituto Ecuatoriano de Normalización.

Fuente: INEN-1528, 2012.

- Requisitos microbiológicos. Al análisis microbiológico correspondiente, los quesos frescos no madurados deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas.
- Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la Tabla 3 (18).

Tabla 3. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.

Requisito	n	m	M	C	Método de ensayo
<i>Enterobacteriaceas</i> , UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-		ISO 11290-1
<i>Salmonella</i> en 25g	5	ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15

NTE INEN: Norma Técnica Ecuatoriana del Instituto Ecuatoriano de Normalización.

Fuente: INEN-1528, 2012.

Donde:

n = Número de muestras a examinar.

m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

- Aditivos. Se pueden utilizar los aditivos permitidos y en las cantidades especificadas en la NTE INEN 2074 y, además:

a) Gelatina y almidones modificados (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los estabilizadores, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)

b) Harinas y almidones de arroz, maíz y papa (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los antiaglutinantes para el tratamiento de la superficie de productos cortados, rebanados y desmenuzados únicamente, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)

Contaminantes. El límite máximo permitido debe ser el que establece el Codex alimentarius de contaminantes CODEX STAN 193-1995, en su última edición (18).

Requisitos complementarios

- Los quesos frescos no madurados deben mantenerse en cadena de frío durante el almacenamiento, distribución y comercialización a una temperatura de $4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y su transporte debe ser realizado en condiciones idóneas que garanticen el mantenimiento del producto.
- Las unidades de comercialización de este producto deben cumplir con lo dispuesto en la Ley 2007-76 del Sistema Ecuatoriano de la Calidad (18).

2.2.3. Requisitos para quesos crema en México.

A continuación, se presenta la Tabla 4 de requisitos bromatológicos para quesos crema en México.

Tabla 4. *Requisitos bromatológicos para quesos crema.*

Especificaciones	Rango	
	Max.	Min.
Sólidos totales %	35	40
Proteínas %	10	-
Cenizas %	0,5	-

Fuente: Normatividad Mexicana, especificaciones bromatológicas para quesos crema (19).

2.2.4. Bacterias lácticas.

Son probióticos han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace mucho tiempo, que siendo consumidas en cantidades adecuadas son beneficiosas para la salud humana, Metchnikoff, investigador del siglo XIX, relacionó desde hace más de un siglo el efecto benéfico sobre la misma, con el consumo de leche fermentada que contenía cierto tipo de bacilos. Los géneros más conocidos de las BAL son las *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* y se agrupan en dos tipos según el resultado de la fermentación del producto final como las homofermentadoras y heterofermentadoras (10; 11; 19).

Las bacterias ácido lácticas crecen en pH desde 3,2 hasta 9,6 medios donde otras bacterias no sobrevivirían, tienen propiedades terapéuticas y nutricionales y de ella se pueden obtener productos como quesos, yogurt, encurtidos, ensilados y embutidos. Poseen también grandes características como participar en la fermentación de la leche, intervención en la elaboración de vinos y cervezas, mejoradoras significativamente del sabor, olor, textura, de los alimentos y a su vez contribuyen en la biopreservación de los mismos (10; 11).

Las BAL se pueden obtener de diferentes fuentes microbianas, como es el caso de la primera fase de fermentación anaeróbica del cacao, es decir, en las primeras 48 horas, la pulpa blanca denominada mucílago sufre un proceso de contaminación sucesiva de microorganismos, luego de la fermentación por levaduras, se instalan las bacterias lácticas (*Lactococcus spp*) y acéticas (4; 5).

Las *Lactococcus spp* son BAL gram positivas mesófilas, de forma esférica u ovoides, encargadas de transformar el carbohidrato (lactosa) de la leche en ácido láctico, dentro de las industrias lácteas son unas de las principales bacterias utilizadas, principalmente en la elaboración de quesos cheddar y colby, quesos azules, además se emplean en la preparación de quesos de textura suave, como el queso crema, en la obtención de crema ácida y mantequilla, brindándoles características como realzar el sabor y el aroma, además alargar la vida de anaquel del producto (20).

2.2.5. El cacao.

El cacao es un fruto de forma similar a las almendras, de sabor amargo, color púrpura. La cáscara (testa) representa 10-14% del peso seco de la semilla de cacao, mientras que el núcleo o cotiledón se compone de la mayor parte del restante 86-90%. El cotiledón confiere sabores y aromas característicos de chocolate (21). El cacao fue cultivado por los mayas, cuya semilla tostada y molida usaron para elaborar bebidas de chocolate y su consumo estuvo asociado con riqueza y poder. Los mayas establecieron las primeras plantaciones cacaoteras en Centroamérica. Dentro de las variedades de cacao se encuentra el fino de aroma o también llamado cacao arriba, criollo o Nacional cuenta con un color característico amarillo, un sabor y aroma exclusivos. (22; 23).

El cacao está formado de una corteza áspera de alrededor de 4cm de espesor, dentro de la mazorca se encuentra una pulpa viscosa, dulce y comestible, que recubren la semilla llamada mucilago, no aprovechado en la actualidad, teniendo un alto valor nutricional, las cadenas comerciales se han enfocado únicamente a la venta y aprovechamiento de la semilla del cacao (24).

2.2.6. Mucilago de cacao.

El mucilago es una sustancia de origen vegetal obtenida del cacao, de apariencia viscosa, de peso molecular alto, mayor a 200000 g/gmol. Su composición es muy parecida a las de las gomas y pectinas, según recientes investigaciones su jugo es usado en la elaboración de mermeladas, jaleas y bebidas alcohólicas (13; 14; 25). La pulpa del cacao está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1-2%), y sales (8-10%) (26). Cumple un papel muy importante dentro de la elaboración de chocolate brindando características propias del cacao como el olor y el sabor, además promueve el desarrollo de bacterias dedicadas a la fermentación, luego de ser fermentado el mucilago puede ser utilizado para la obtención de licor, países como Brasil y Costa Rica ya han utilizado el mucilago para la elaboración de subproductos (27). A continuación, se presenta la Tabla 5, donde se muestra la composición química de la pulpa de cacao.

Tabla 5. *Composición química de la pulpa de cacao.*

Componente	Antes de la fermentación	Después de la fermentación
Agua	82 – 87%	45 – 7%
Sacarosa	12%	0%
Ácido cítrico	1 – 2%	0,5%
Pectina	1,5%	-
pH	3,7	6,5
Alcohol	-	
Etílico		0,5%
Ácido acético	-	1,6%

Fuente: *Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and its transformation into (28).*

CAPÍTULO III

MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización.

La investigación se realizó en el campus “La María” Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en el km 7 vía Quevedo-El Empalme. Cantón Mocache, Los Ríos, Ecuador.

3.1.1. Condiciones meteorológicas.

Las condiciones meteorológicas donde se desarrolló la presente investigación se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. *Condiciones meteorológicas aproximadas del cantón Mocache.*

Datos meteorológicos	Valores promedio
Humedad relativa (%)	85,84
Temperatura °C	25,47
Precipitación (mm anual)	2223,85
Heliofania (horas luz/año)	898,66
Zona ecológica	Bosque semi húmedo tropical

Fuente: Estación Meteorológicas del INAMHI ubicada en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP (2013).

Elaborado por: Autor.

3.2. Tipos de investigación.

Se plasmó una investigación exploratoria, descriptiva y experimental; puesto que no se ha encontrado datos sobre la elaboración de queso crema con bacterias lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.

Investigación exploratoria.

Es aquella que se efectúa sobre un tema u objeto desconocido o poco estudiado, por lo que sus resultados constituyen una visión aproximada de dicho objeto, o sea, un nivel superficial de conocimiento (29).

Investigación descriptiva.

La investigación descriptiva, también conocida como investigación estadística, describe los datos y características de la población o fenómeno en estudio. La investigación descriptiva responde a las preguntas: quién, qué, dónde, porque, cuándo y cómo (29).

Investigación experimental.

Esta investigación es experimental porque se realizó varios ensayos, para poder analizar el efecto de las bacterias ácido lácticas del mucílago del cacao en la elaboración de queso crema.

3.3. Métodos de investigación.

En la investigación los métodos utilizados fueron los siguientes:

Método inductivo – deductivo:

Se empleó este tipo de investigación, buscando dar soluciones partiendo de un problema, el mismo que permitió obtener una tecnología adecuada para la obtención de queso crema con bacterias lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.

Métodos estadísticos:

Con la ayuda de un software, se cuantifico, se tabuló y ordenó los datos obtenidos mediante análisis, los mismos que permitieron encontrar los resultados.

3.4. Fuentes de recopilación de la investigación.

En la presente investigación se elaboró queso crema con bacterias lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma para obtenerlo, se utilizaron las siguientes fuentes:

- Trabajo directamente al campo experimental donde se llevó a cabo la elaboración de queso crema.
- Investigación en el laboratorio.
- Consulta de artículos científicos publicados en páginas web: Science Direct, Pubmed, Scielo, Google académico, etc.

3.5. Diseño de la investigación.

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con 4 repeticiones, se elaboraron 4 quesos crema fermentados a diferentes temperaturas. Para la comparación de las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.6. Esquema del ANDEVA.

En la siguiente Tabla 7, esquema se muestra el análisis de varianza.

Tabla 7. *Esquema del ANDEVA.*

Fuente de variación (FV)		Grados de libertad (GL)	
Tratamiento	(t-1)	(4-1)	3
Error experimental	t(r-1)	4(4-1)	12
Total	t*r-1	4*4-1	15

Elaborado por: Autor.

3.6.1. Modelo matemático.

Las fuentes de variación para la presente investigación se efectuaron con el siguiente modelo matemático, cuyo esquema corresponde a:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} =Total, de las observaciones en estudio.

μ =Efecto de la media general.

T_i =Efecto de los tratamientos en estudio.

ε_{ij} = Efecto aleatorio o error experimental.

3.6.2. Esquema del experimento.

En la Tabla 8 se plantea el esquema del experimento con los tratamientos, repeticiones y unidades experimentales de una manera detallada, en donde cada una de ellas estuvo conformada por 69 g de queso crema dando un subtotal de 276 g de queso crema.

Tabla 8. *Esquema del experimento con los tratamientos, repeticiones y unidades experimentales.*

Tratamientos	Repeticiones	Unidad experimental (g)	Total (g)
T1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).	4	69	276
T2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).	4	69	276
T3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).	4	69	276
T4 (Queso crema fermentado a 45 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).	4	69	276
Total			1104

Elaborado por: Autor.

3.7. Instrumentos de la investigación.

Los instrumentos de investigación que se aplicaron en el presente experimento, fueron los siguientes:

3.7.1. Variables bromatológicas evaluadas.

A los tratamientos en estudio se le realizaron análisis bromatológicos como el pH, grasa, humedad, cenizas y proteína siguiendo las respectivas técnicas establecidas en la norma INEN 1528.

- a) El análisis de pH se realizó con un pHmetro, colocando el electrodo en la muestra de queso crema, y se conoció el valor.
- b) En el porcentaje de proteína se siguió el procedimiento técnico detallado en el Anexo 3.
- c) La humedad se llevó a cabo, bajo lo establecido en la norma INEN 63, detallada en el Anexo 4.
- d) El porcentaje de grasa se lo conoció empleando la norma INEN 64, detallada en el Anexo 5.
- e) En la determinación de la ceniza, se realizó siguiendo la técnica detallada en el Anexo 6.

3.7.2. Variables microbiológicas evaluadas.

A los tratamientos se les realizó un análisis microbiológico para determinar la carga bacteriana presente en cada uno de ellos, utilizando el agar MacConky, que permitió conocer si existía la presencia de las bacterias *E. Coli* y *Salmonella* en los quesos crema, para lo cual se toma las referencias de la norma NTE INEN 1 529 – 7.

3.7.3. Variables organolépticas evaluadas.

Para validar la aceptación de los tratamientos se evaluaron las principales características tales como: sabor, olor y textura a través de la prueba afectiva representadas en el Anexo 7, para la cual se usaron 15 panelistas y se etiquetaron las muestras de queso crema, rotulándolas de la manera siguiente: T1, T2 y T3. Los resultados obtenidos se tabularon en un programa estadístico de software libre y se conoció el tratamiento que tuvo mayor aceptación de parte de los catadores.

3.7.4. Procedimiento experimental.

3.7.4.1. Recolección del mucílago de cacao.

Se obtuvieron dos mazorcas de cacao fino de aroma, las cuales fueron lavadas antes de su utilización, después se pasó a realizarles cortes en los lados y manualmente se abrieron cada una de las mazorcas, para la obtención de la materia prima se usó un lienzo estéril y aplicando presión a los frutos se filtró el mucílago, el cual se recolectó en un envase previamente esterilizado con tapa, para la posterior fermentación por 48 horas a temperatura ambiente.

3.7.4.2. Preparación de medio de cultivo Man rogosa y sharpe (MRS).

- ✓ Se pesó 45 g de medio de cultivo Man rogosa y sharpe o MRS.
- ✓ Luego se disolvieron en 500 mL de agua destilada en un matraz con una pastilla de agitación y se colocó en un calentador de agitación eléctrico hasta que alcanzó el punto de ebullición.
- ✓ En seguida se esterilizó a una temperatura de 180 °C durante 20 minutos.

3.7.4.3. Preparación del agua peptonada.

- ✓ Se pesó 1,5 g de peptona.
- ✓ Se disolvieron en 150 mL de agua destilada en un matraz con una pastilla de agitación y se colocó en un calentador de agitación eléctrico durante 15 minutos a 100 °C.
- ✓ Posteriormente se esterilizó a una temperatura de 180 °C durante 20 minutos junto al medio de cultivo MRS.

3.7.4.4. Obtención de cepas de *Lactococcus spp.*

Fueron obtenidas por el sembrado de 10 mL de mucílago fermentado, disueltos en 90 mL de agua peptonada, de la cual se tomó 1 µL con una micro pipeta y se agregó directamente a las cajas petri, previamente llenadas con 20 mL de medio de cultivo MRS, mismas que fueron incubadas por 72 horas a 37 °C en condiciones anaerobias, luego con la ayuda de una aza estéril en la cabina de bioseguridad se tomaron 20 cepas de *Lactococcus spp* que con la ayuda de un agitador vórtex se disolvieron en tubos de ensayo con 5 mL de leche, luego se agregó en la leche con la que se elaboró el queso crema.

3.7.5. Elaboración de queso crema.

Se tomaron 2000 mL de leche entera, pasteurizada y con una temperatura ambiente por cada tratamiento divididos por las repeticiones en 500 mL, se agregó la solución de 5 mL, mezclando lentamente en tarrinas estériles, se taparon y se colocaron en baño maría a diferentes temperaturas de 35, 40 y 45 °C y otras se dejaron al ambiente aproximadamente a 30 °C, todas por 24 horas.

Una vez realizada la incubación con bacterias a diferentes temperaturas, se realizó el desuerado para obtener el queso crema, tomando los pesos en una balanza gramera, antes y después de la pérdida del suero, después se agregó 1,5% de sal refinada sobre el peso del queso crema que resultó del proceso, finalmente se procedió a almacenar a una temperatura de 8 °C para la elaboración de los diferentes análisis.

3.7.6. Diagrama de bloques para la obtención de queso crema con BAL provenientes del mucílago de cacao.

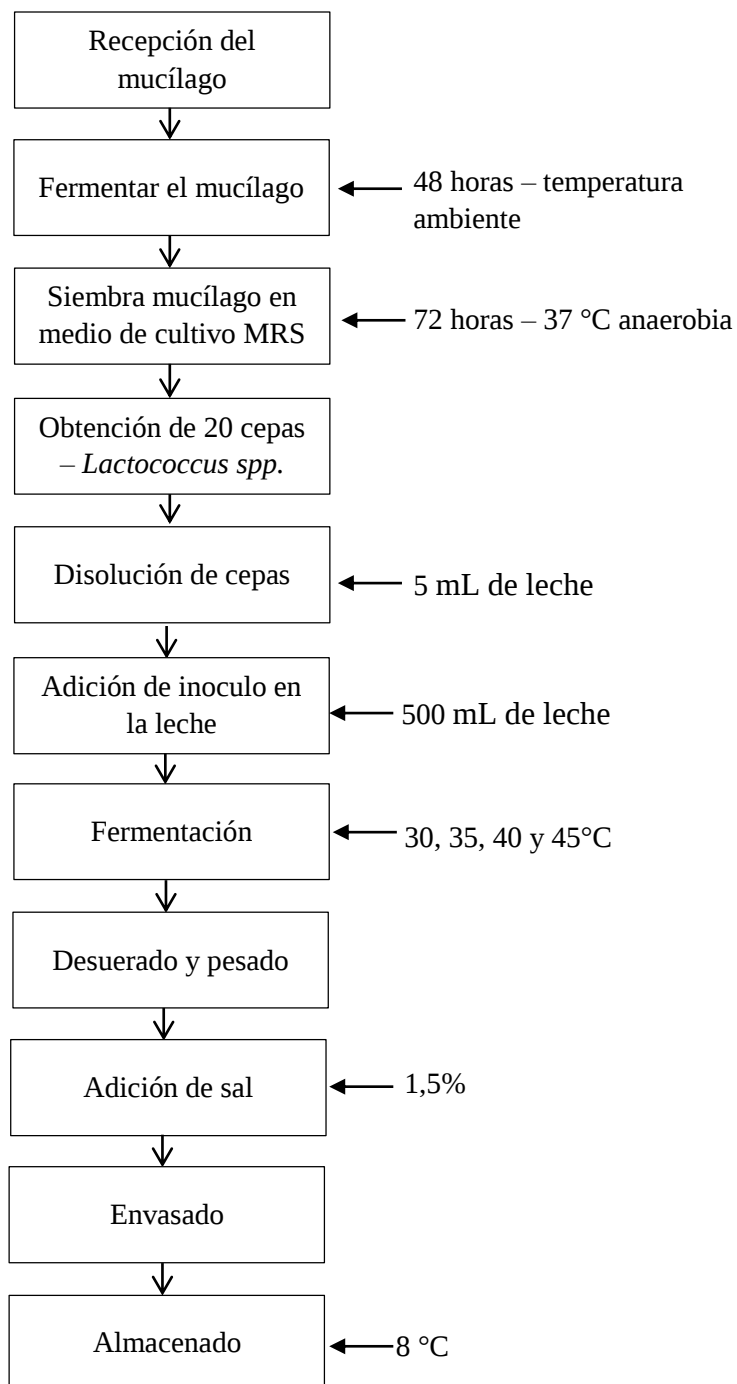


Figura 1: Diagrama de bloques del proceso para la obtención de queso crema con BAL provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.

Elaborado por: Autor.

3.8. Tratamiento de los datos.

En la Tabla 9, se detalla la descripción de los tratamientos en estudio para la obtención de queso crema con bacterias lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma con 4 temperaturas de fermentación diferentes.

Tabla 9. Descripción de los tratamientos en estudio.

Tratamiento	Descripción	Código
1	Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao.	QCF30°CBALMC
2	Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao.	QCF35°CBALMC
3	Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao.	QCF40°CBALMC
4	Queso crema fermentado a 45 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao.	QCF45°CBALMC

Elaborado por: Autor.

3.9. Recursos humanos y materiales.

Esta investigación se realizó con la asistencia del director propuesto de la Tesis el Ing. Christian Vallejo ya que con él se estableció el tema y se llevó acabo la tabulación de los datos obtenidos con el software libre que se utilizó para la comparación de las medias de los tratamientos. Demás recursos humanos con los que se contó fue la Ing. Lourdes Villavicencio encargada del Laboratorio de Bromatología, el Dr. Orly Cevallos quien colaboró para el análisis microbiológico a desarrollar.

El queso crema se preparó con: bacterias obtenidas del mucilago de cacao fino de aroma, obtenido de una finca alrededor de la ciudad de Quevedo, la leche que se utilizó fue de vaca entera, pasteurizada de la marca comercial El Ranchito, se le agrego sal Cris-Sal.

3.9.1. Materia prima.

- Cacao fino de aroma.

3.9.2. Insumos.

- Leche pasteurizada.
- Mucílago de cacao fino de aroma.
- Sal.

3.9.3. Equipos.

- Baños maría.
- Refrigeradora.
- Incubadora.
- Vórtex.
- Contador de colonias.
- Cabina de bioseguridad tipo II.
- Autoclave.
- Calentador –agitador.
- Mufla con regulador de temperatura, ajustada a 600 °C.
- Estufa con regulador de temperatura.
- Balanza analítica.
- Balanza gramera.
- Centrifuga.
- Destilador de proteínas.
- pH-metro.
- Computadora.
- Impresora.

3.9.4. Materiales de laboratorio.

- Cajas petri.
- Bureta graduada y accesorios.
- Lienzo.
- Tubos de ensayos.
- Matraces erlenmeyer.
- Plástico parafilm.
- Papel aluminio.
- Mechero.
- Pipetas.
- Gasa.
- Algodón.
- Espátula.
- Gradilla.
- Mandil.
- Guates de látex.
- Cofia.
- Mascarilla.
- Cisoles de porcelana.
- Tarrinas de plástico estériles.
- Cuchara.
- Pinzas.

3.9.5. Reactivos.

- Ácido sulfúrico concentrado 96% ($d = 1,84$).
- Solución de hidróxido de sodio al 40%.
- Solución de ácido bórico al 2%.
- Solución de ácido clorhídrico 0,1 N (HCl), debidamente estandarizada.
- Tabletas catalizadoras.

- Indicador kjeldahl.
- Agua destilada.
- Alcohol isoamilico.
- Agar MRS.
- Agar MacConky.
- Agua peptona.
- Alcohol 96°.
- Cloro.

3.9.6. Materiales de oficina.

- Cuaderno de apuntes.
- Pendrive.
- Carpetas de varilla.
- Materiales de oficina.
- Cámara fotográfica.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión.

En la fermentación de los quesos crema se evaluó el efecto de las temperaturas 30, 35, 40 y 45 °C con bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp.* durante la evaluación se encontró que el tratamiento 4 (Queso crema fermentado a 45 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao), no presento crecimiento, es decir no sobreviviendo a la temperatura de 45 °C. Al respecto Chen et al. (31), reporta en su investigación de adaptación de *Lactococcus* a temperaturas no mayor a los 40 °C de crecimiento conduce a un aumento espectacular de la tasa de acidificación, indica que la temperatura optima de dichas bacterias es de 30 °C con un crecimiento hasta los 40 °C.

4.1.1. Análisis bromatológicos de los quesos crema.

A continuación, se presenta la Tabla 10, donde se demuestra que en los análisis bromatológicos de las variables humedad, proteínas y pH se halló diferencia estadística significativa entre los tratamientos evaluados ($p \leq 0,05$), en los cuales las medias constan con letra diferente, mientras que en la determinación de grasas y cenizas no existió diferencia estadística significativa entre tratamientos, por lo cual presentan letras similares.

Tabla 10. Promedios de los análisis bromatológicos realizados a los quesos crema.

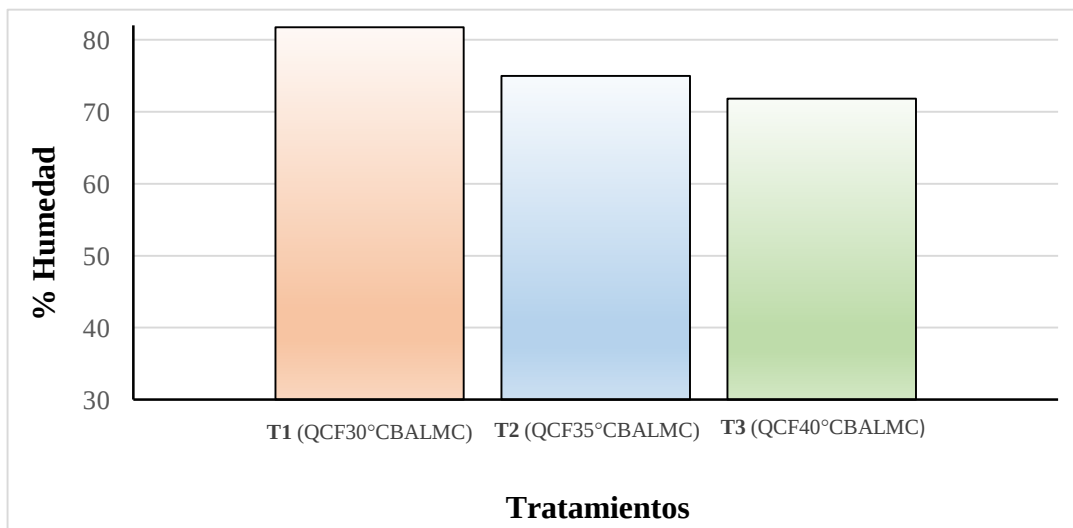
Análisis	Tratamientos				Probabilidad
	T ₁ (QCF30°C BALMC)	T ₂ (QCF35°C BALMC)	T ₃ (QCF40°C BALMC)	T ₄ * (QCF45°C BALMC)	
Humedad %	81,72 ^a	74,98 ^b	71,80 ^c	No determinado	<,0001
Cenizas %	2,29 ^a	2,31 ^a	2,37 ^a	No determinado	0,1124
Proteínas %	8,53 ^a	8,84 ^b	10,92 ^c	No determinado	<,0001
Grasa %	6,60 ^a	6,75 ^a	6,65 ^a	No determinado	0,6353
pH	4,89 ^a	4,71 ^b	4,53 ^c	No determinado	<,0001

*T₄: No hubo fermentación por parte de las bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp.*

Elaborado por: Autor.

4.1.1.1. Resultados de la variable humedad.

Figura 2. Promedios de humedad de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.



Nomenclatura: T1= tratamiento 1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T2= tratamiento 2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T3= tratamiento 3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).

- La cantidad de humedad es expresa en porcentaje por cada 100 g de producto.

Elaborado por: Autor.

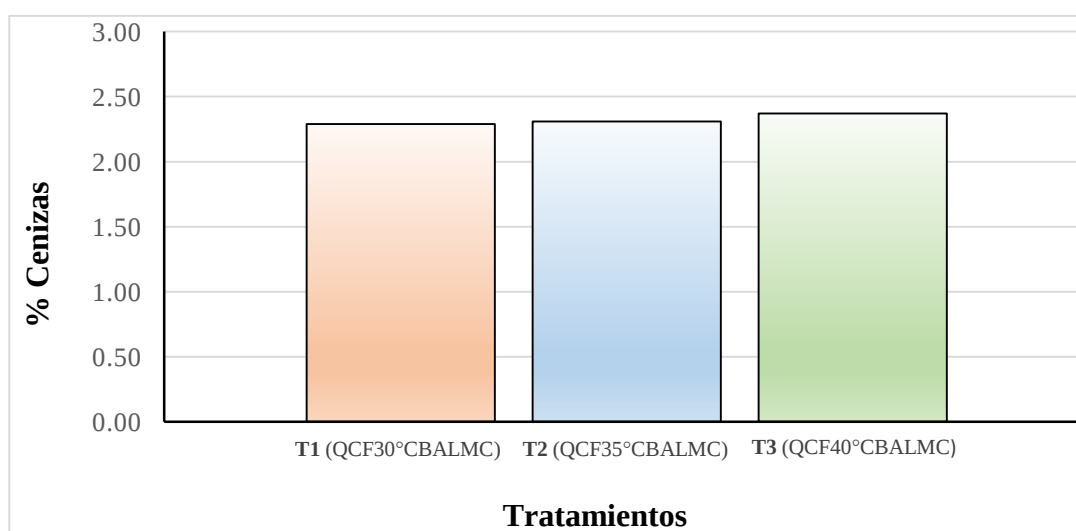
En base al análisis ANDEVA en la Tabla 10, la variable de humedad de queso crema, se muestra que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos evaluados ($p \leq 0,05$). Pero es importante señalar que el T1 presentó el mayor contenido de humedad de 81,72%, y el T3 presentó el menor contenido con 71,80%.

Al realizar una comparación con la NTE INEN 1528, se demuestra que los valores del T2 y T3 se encuentran dentro de los rangos permitidos, que corresponden a max. 80%. Molina (17), en la evaluación de los factores que afectan en el rendimiento del queso crema, obtuvo valores inferiores de 51,12%. Romero et al. (30), en la evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema, determinaron un valor de 56,22% de humedad. Phadungath (1), en su revisión a las variedades de queso crema, registro el 70% de humedad, siendo este próximo al T2 y T3 de la presente investigación.

La diferencia presentada en el contenido de humedad de los quesos crema, se relaciona con el factor principal de esta investigación que es la temperatura, ya que, al aumentar calor, existe mayor evaporación disminuyendo el porcentaje de agua en el producto, lo que concuerda con Bain (33), que considera, a la temperatura de fermentación como un factor importante en el rendimiento del queso, e indica que a mayor temperatura, aumentan las pérdidas de humedad, disminuyendo el peso del queso, debido a la evaporación.

4.1.1.2. Resultados de la variable ceniza.

Figura 3. Promedios de ceniza de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.



Nomenclatura: T1= tratamiento 1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T2= tratamiento 2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T3= tratamiento 3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).

- La cantidad de ceniza es expresa en porcentaje por cada 100 g de producto.

Elaborado por: Autor.

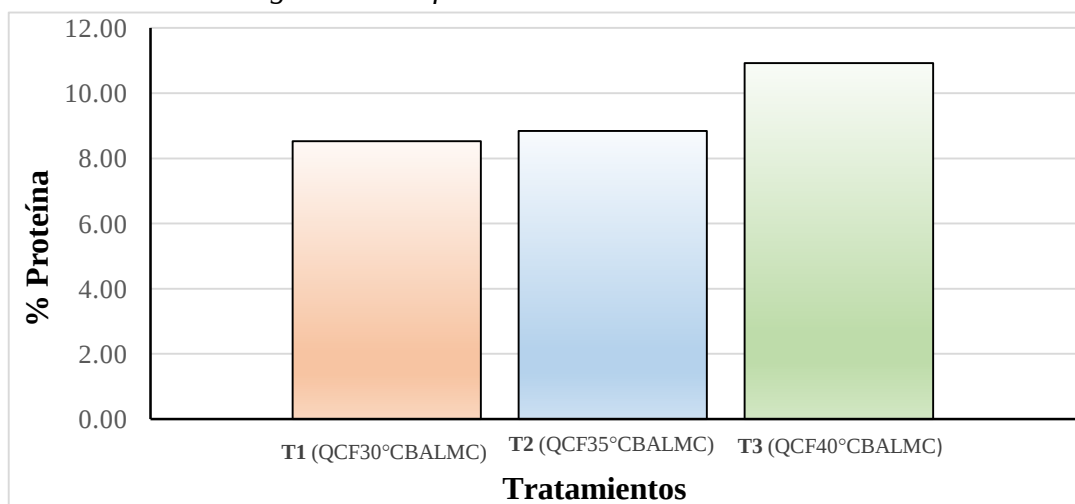
De acuerdo al ANDEVA en la Tabla 10, la variable ceniza no se muestra diferencia estadística significativa entre los tratamientos evaluados ($p \leq 0,05$), obteniendo una media general de 2,33%, cabe señal que el mayor promedio lo obtuvo el tratamiento 3 con 2,37%, mientras el tratamiento 1 presento el menor valor con 2,29%.

Al comparar con la NMX-F-094 se demuestra que los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos permitidos con el mín. de 0,5% y el máx. -. Muñoz (17), en el estudio de los alimentos y sus nutrientes, obtuvo un porcentaje menor de 1,17% de cenizas. Romero et al. (30), en la evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema, mostraron 4,96% por encima de los valores obtenidos experimentalmente. Molina (31), en la evaluación de los factores que afectan en el rendimiento del queso crema, presentó un contenido de 2,76% próximo a los obtenidos en este estudio.

Los porcentajes de ceniza, de los quesos analizados no presentaron amplias diferencias, pese a las distintas temperaturas de fermentación que fueron sometidos, ya que estas, no fueron superiores a los 40 °C, lo que concuerda con Pedro (35), que todo tratamiento térmico superior a la temperatura de pasteurización afecta negativamente la retención del material inorgánico, principalmente el calcio y el fósforo.

4.1.1.3. Resultados de la variable proteína.

Figura 4. Promedios de proteínas de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.



Nomenclatura: T1= tratamiento 1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T2= tratamiento 2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T3= tratamiento 3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).

- La cantidad de proteínas es expresada en porcentaje por cada 100 g de producto.

Elaborado por: Autor.

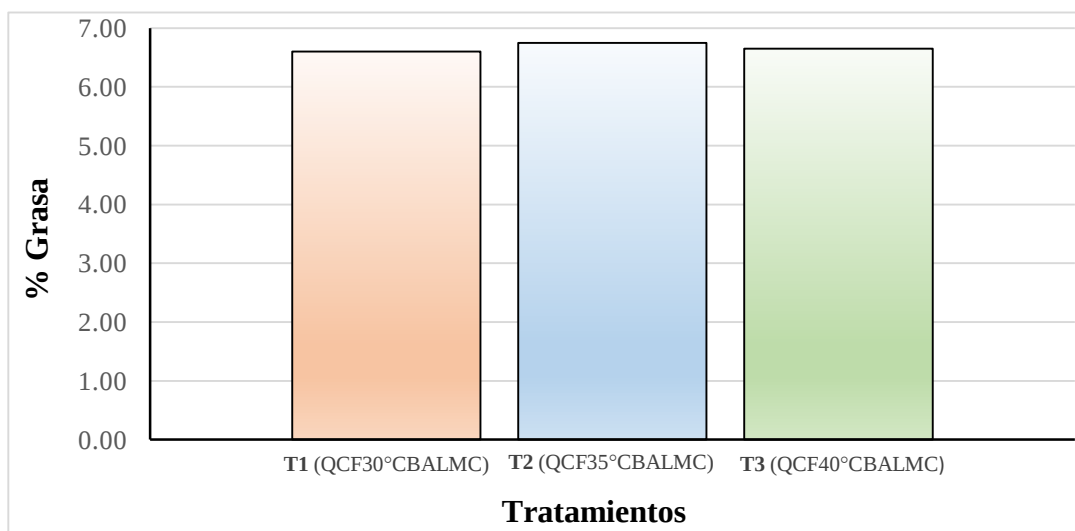
En la variable proteína según el análisis ANDEVA en la Tabla 10, se halló que hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos evaluados ($p \leq 0,05$), con una media de los tratamientos de 9,44%, siendo el T1 con el menor valor de 8,53% frente al T3 con un 10,92%.

Al comparar estos valores con la NMX-F-098 se muestra que el T3 se encuentra dentro de los rangos permitidos que indica un min. de 10% y un máx. -. Romero et al. (30) en la evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema, determinaron un valor superior de 33,81% al igual que Molina (31) en su investigación de la evaluación de los factores que afectan en el rendimiento del queso crema, obtuvo 19,89%. Muñoz (17) determino un valor inferior de 7,55% en su estudio de los alimentos y sus nutrientes de queso crema. Según González (32), las bacterias lácticas son las encargadas de la formación del coágulo en los quesos modificando la casina (proteína de leche).

La variabilidad de los resultados presentados en el contenido de proteínas de los quesos crema, se debe a las diferentes temperaturas en la fermentación, que ocasionó una disminución en el porcentaje de humedad, y produjo un incremento en la firmeza proteica, por lo cual se presenta una coherencia entre los tratamientos respecto a humedad – proteína, que, a menor contenido de agua, mayor es el porcentaje de proteínas, lo que coincide con Ramírez y Vélez (16), que dicen, que el efecto de pérdida de humedad, conduce a una mayor interacción de las proteínas, provocando una mayor firmeza de la matriz proteica.

4.1.1.4. Resultados de la variable grasa.

Figura 5. Promedios de grasa de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.



Nomenclatura: T1= tratamiento 1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T2= tratamiento 2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T3= tratamiento 3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).

- La cantidad de grasa es expresa en porcentaje por cada 100 g de producto.

Elaborado por: Autor.

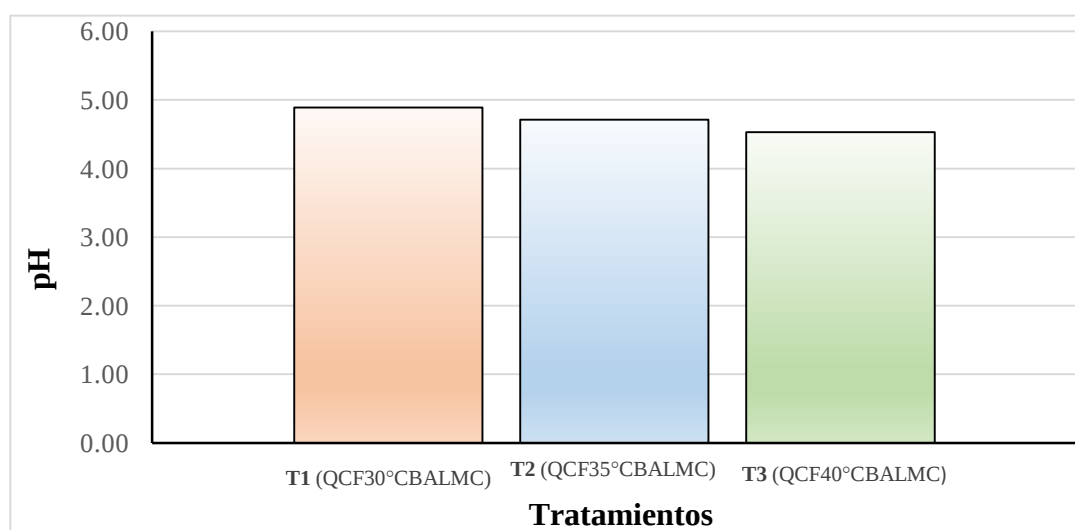
Según el análisis ANDEVA en la Tabla 10, la variable de grasa del queso crema, se muestra que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos evaluados ($p \leq 0,05$), resultando una media de 6,67%, siendo mayor el T2 con un 6,75% y el T1 con contenido menor del 6,60%.

Al realizar una comparación con la NTE INEN 1528, se demuestra que los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos permitidos, que corresponden a max. – y min. – . Valencia et al. (32), en la estimación de la vida útil fisicoquímica, sensorial e instrumental de queso crema bajo en calorías, determinaron un valor superior a los del presente estudio de 15%, al igual que Parra y Fonseca (33), en la caracterización fisicoquímica, proximal y sensorial de un queso tipo crema saborizado, con un contenido del 11,65%.

Los valores de grasa obtenidos de los quesos crema, no mostraron amplias diferencias entre tratamientos, pese a las distintas temperaturas de fermentación que fueron sometidos, debido a que el efecto de la temperatura en la grasa, se ve reflejado en la reología del producto, es decir que los cambios térmicos a los que se someta el queso, afectara únicamente en el estado de la misma, lo que concuerda con Castro et al. (39), que dice, que el efecto de la temperatura baja, en la grasa garantiza cierta elasticidad y reduce tendencias de aglutinamiento del queso y por el contrario cuando es sometido a altas temperaturas, la grasa pasa a un estado líquido, permitiendo la fusión del queso.

4.1.1.5. Resultados de la variable pH.

Figura 6. Promedios de pH de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.



Nomenclatura: T1= tratamiento 1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T2= tratamiento 2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T3= tratamiento 3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).

Elaborado por: Autor.

De acuerdo al ANDEVA en la Tabla 10, en el pH se observó que existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos evaluados ($p \leq 0,05$), se obtuvo una media de 4,71, siendo el T1 el valor más elevado con un 4,89 y el T3 el más bajo con el 4,53.

Los valores fueron comparados con el rango de pH establecido en quesos crema de 4,4 a 4,9, demostrando que todos se encuentran dentro de los rangos permitidos. En el estudio que realizaron, Romero et al. (30), en el tema de la evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema, presentaron un pH de 4,57, al igual que el T3 de este estudio, mientras que Ramos et al. (34), en la elaboración de quesos crema con probiótico (*L.casei*), bajo en grasa, adicionado con inulina y saborizado obtuvieron un pH de 4,1, inferior a todos los tratamientos de este estudio al igual que Parra y Fonseca (33), en la caracterización fisicoquímica, proximal y sensorial de un queso tipo crema saborizado, con un 4,29.

La diferencia presentada en los valores de pH, se debe al efecto de la temperatura en la fermentación al que fueron sometidos los quesos crema, es decir que entre mayor fue el calor (40 °C), hubo mayor producción de ácido láctico, al convertir la lactosa, considerando un mejor desarrollo de las bacterias en estudio, lo que se inclina con el estudio realizado por Ahmed et al. (41), identificaron que las bacterias *Lactococcus spp.* crecen rápidamente a una temperatura de 37 °C, generando mayor cantidad de ácido láctico, por tanto, un pH inferior.

4.1.2. Análisis microbiológico de los quesos crema.

A continuación, se presenta la Tabla 11, donde se muestran los resultados del conteo microbiológico realizados a los quesos crema, los parámetros fueron las diferentes bacterias gram negativas presentes en cada tratamiento.

Tabla 11. Resultados del conteo microbiológico realizado a los quesos crema.

Parámetro (UFC/G)	Tratamientos			
	T ₁ QCF30°CBALMC	T ₂ QCF35°CBALMC	T ₃ QCF40°CBALMC	T ₄ * QCF45°CBALMC
<i>E. coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	No determinado
<i>Salmonella</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	No determinado

*T₄: No hubo fermentación por parte de las bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp.*

Elaborado por: Autor

En base a la Tabla 11, el parámetro microbiológico de la bacteria *Escherichia coli*, se demostró la ausencia en todos los tratamientos. Al realizar una comparación con la NTE INEN 1528, se demuestra que los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos permitidos, que corresponden a <10 para índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad y 10 para índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad. Según Romero et al. (30) en la evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema, determinaron la presencia de la *E. coli* en todos sus tratamientos, al igual que Ramos et al. (35) en el aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical.

El parámetro de la bacteria *Salmonella*, como lo indica la Tabla 11, se señala la ausencia en todos los tratamientos. Al realizar una comparación con la NTE INEN 1528, se demuestra que los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos permitidos, que corresponden a ausencia para índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad y - para índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad. Según Romero et al. (30) en la evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema, hallaron la presencia de *Salmonella* únicamente en el tratamiento 3 de los 5 tratamientos en estudio.

La usencia de las bacterias Gram negativas, analizados en los quesos crema, se debe al buen manejo aséptico que se llevó durante el proceso de la elaboración, además se atribuye a la producción de ácido láctico que se genera en el proceso de fermentación del producto, que es uno de los encargados de reducir el riesgo de la presencia de patógenos, al igual que lo manifiestan Ramos et al. (42), en su investigación de: Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical.

4.1.3. Análisis organolépticos de los quesos crema.

A continuación, se presenta la Tabla 12, donde se demuestran las medias de cada variable del análisis organoléptico, en las cuales, las que constan con una letra diferente, es porque existe diferencia estadística significativa y donde no existió diferencia entre cada tratamiento, presentan una letra en común.

Tabla 12. Promedios de los análisis organolépticos realizados a los quesos crema.

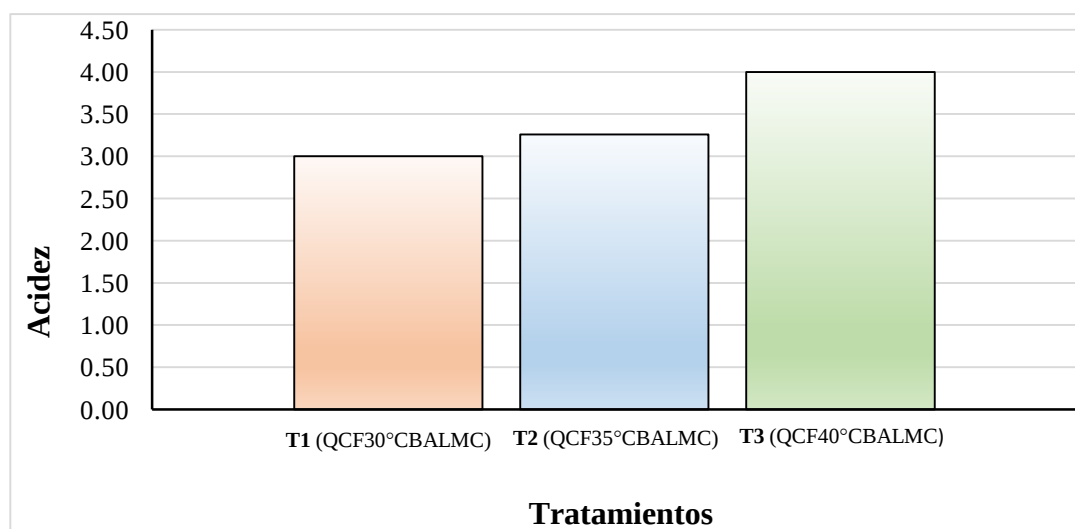
Parámetro organoléptico	Tratamientos				Probabilidad
	T ₁ QCF30°C BALMC	T ₂ QCF35°C BALMC	T ₃ QCF40°C BALMC	T ₄ * QCF45°C BALMC	
Acidez	3,00 ^a	3,26 ^{ab}	4,00 ^b	No determinado	0,0160
Sabor	3,60 ^a	4,20 ^a	4,73 ^b	No determinado	0,0002
Olor	3,20 ^a	3,80 ^{ab}	4,33 ^b	No determinado	0,0003
Textura	3,20 ^a	3,46 ^{ab}	3,93 ^b	No determinado	0,0314

*T₄: No hubo fermentación por parte de las bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp.*

Elaborado por: Autor.

4.1.3.1. Resultado de la variable acidez.

Figura 7. Promedios de acidez sensorial de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.



Nomenclatura: T1= tratamiento 1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T2= tratamiento 2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T3= tratamiento 3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).

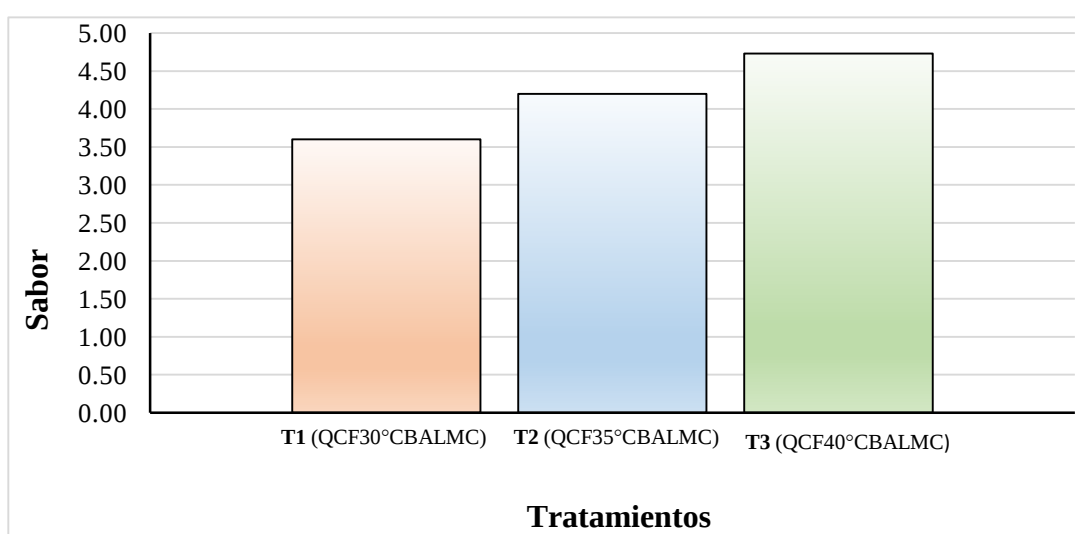
Elaborado por: Autor.

De acuerdo al análisis ANDEVA en Tabla 12, la acidez presentó diferencia estadística significativa entre el T1 en comparación al T3, evaluados ($p \leq 0,05$). El T3 mostró el mayor

valor de 4,0 el cual dentro de la escala corresponde a (acidez agradable), y el T1 presentó el menor valor de 3 correspondiendo a una acidez ligera. Ramos et al. (34) en la elaboración de quesos crema con probiótico (*L.casei*), bajo en grasa, adicionado con inulina y saborizado, obtuvieron una acidez equilibrada, típica del queso crema.

4.1.3.2. Resultado de la variable sabor.

Figura 8. Promedios del sabor de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.



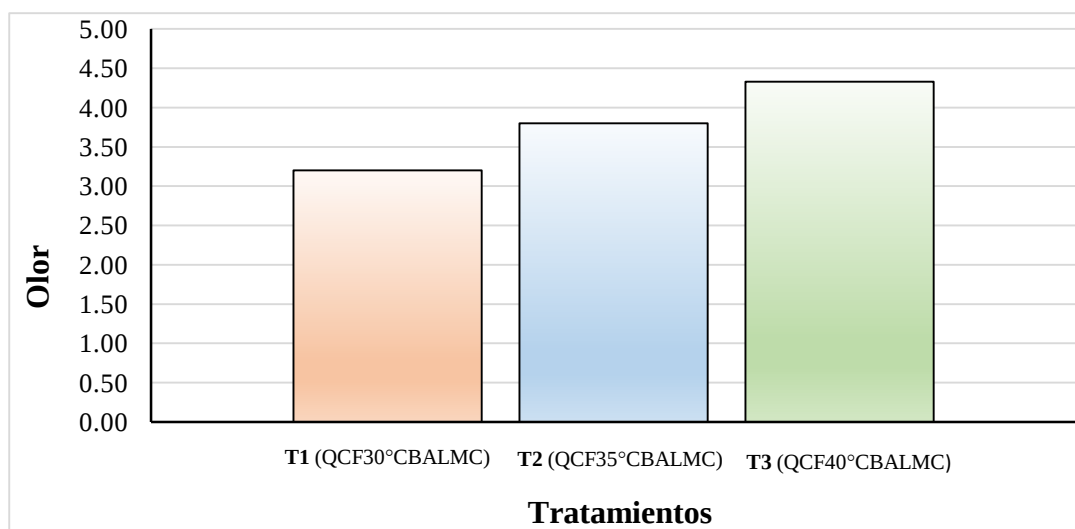
Nomenclatura: T1= tratamiento 1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T2= tratamiento 2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T3= tratamiento 3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).

Elaborado por: Autor.

La variable del sabor en la Tabla 12, demuestra que, si existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos 1 y 2 en comparación al 3, evaluados ($p \leq 0,05$), siendo el T3 con el valor más alto de 5, el cual corresponde a (muy agradable), y el valor más bajo fue del T1 con 4 correspondiendo a (agradable). Parra y Fonseca (33), en la caracterización fisicoquímica, proximal y sensorial de un queso tipo crema saborizado, obtuvieron un 66,6% de aceptación en el sabor dentro de la escala (me gusta mucho).

4.1.3.3. Resultado de la variable olor.

Figura 9. Promedios del olor de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.



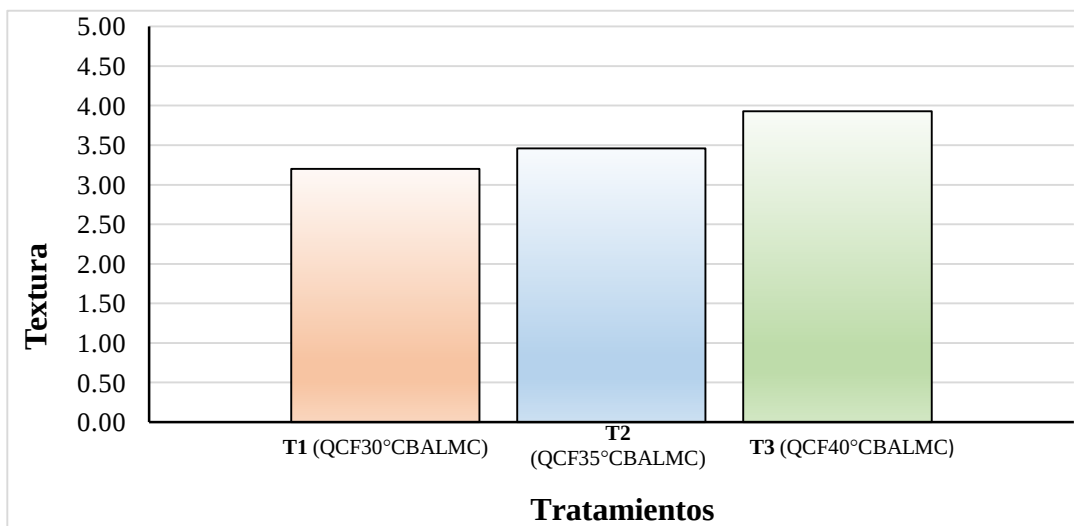
Nomenclatura: T1= tratamiento 1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T2= tratamiento 2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T3= tratamiento 3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).

Elaborado por: Autor.

En base del análisis ANDEVA en la Tabla 12, la variable olor mostró que hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos 1 y 2 en comparación al 3, evaluados ($p \leq 0,05$), el valor mayor del T3 con 4, representado en la escala (agradable) y el menor fue el T1 con 3 que representa (ligeramente agradable). Parra y Fonseca (33), en la caracterización fisicoquímica, proximal y sensorial de un queso tipo crema saborizado, obtuvieron un 66,1% de aceptación en el olor dentro de la escala (me gusta mucho).

4.1.3.4. Resultado de la variable textura.

Figura 10. Promedios de la textura de los quesos crema con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de cacao fino de aroma.



Nomenclatura: T1= tratamiento 1 (Queso crema fermentado a 30 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T2= tratamiento 2 (Queso crema fermentado a 35 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao); T3= tratamiento 3 (Queso crema fermentado a 40 °C con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao).

Elaborado por: Autor.

De acuerdo el análisis ANDEVA en la Tabla 12, la variable textura mostró que hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos 1 y 2 en comparación al 3, evaluados ($p \leq 0,05$), con el valor mayor del T3 con 4, representado en la escala (suave) y el menor fue el T1 con 3 que representa (ligeramente suave). Parra y Fonseca (33), en la caracterización fisicoquímica, proximal y sensorial de un queso tipo crema saborizado, obtuvieron un 22,2% de aceptación en la textura dentro de la escala (me gusta mucho).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

De acuerdo a los objetivos planteados en la presente investigación se establecen las siguientes conclusiones.

- La fermentación de quesos crema en las temperaturas de 30, 35 y 40 °C con bacterias ácido lácticas *Lactococcus spp.*, mostro un crecimiento favorable, no así a los 45 °C, la actividad microbiana se inhibe, consecuentemente las BAL provenientes del mucílago de cacao no colonizarón la muestra de leche.
- Los quesos crema con bacterias ácido lácticas del mucílago de cacao en los tratamientos 1,2 y 3, mediante un análisis microbiológico no presentaron presencia de las bacterias *E. Coli* y *Salmonella*.
- El tratamiento 3 (40 °C de fermentación) presentó mejores características bromatológicas con respecto a los tratamientos 1 y 2, con un pH de 4,53, contenido proteico de 10,92% y una humedad de 71,80%. De igual manera en las variables organolépticas se demostró que el tratamiento 3 fue valorado como agradable con una calificación de 4 puntos, dentro de la escala de 5.

5.2. Recomendaciones.

- Emplear en las industrias lácteas la tecnología para elaboración de queso crema usando bacterias ácido lácticas (*Lactococcus spp.*), del mucílago de cacao, desarrollada en esta investigación, y aprovechar la materia prima (mucílago de cacao) no valorada por los productores de cacao del país.
- En la incubación se propone trabajar en un rango de temperatura entre 30 y 40 °C durante 24 horas, para obtener un queso crema con mejores características bromatológicas y organolépticas.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Literatura Citada.

1. **Phadungath, Chanokphat.** *Cream cheese products: A review..* 1, Tailandia : s.n., 2004, Vol. 27.
2. **Gallardo, Yuzahara Tahnee Mulky.** *Desarrollo del proceso de elaboracion del queso crema para impulsar la industrialización de la leche en la parroquia el Chaupi-Machachi.* Quito : s.n., 2012.
3. **Orozco, Mónica.** *Un tercio de la producción láctea se dedica al queso.* Quito : s.n., 2015.
4. **L. I. Hinestroza Córdoba, A. López Malo.** *Productos lácteos fermentados como vehículo para microorganismos probióticos.* Puebla : s.n., 2008, Temas selectos de Ingenieria en Alimentos , Vol. 2, págs. 50 - 57.
5. **Smilja Lambert, Mars.** *Fermentación del cacao – Aspectos generales.*
6. **Verdezoto, Diana.** *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en el mucílago de cacao (Theobroma cacao l.) Trinitario y nacional.* Quevedo : s.n., 2017.
7. **Torres, Christian Vallejo.** *Manual de leche.* Quevedo : s.n., 2014. Vol. 1.
8. **Bedoya Mejía, Oswaldo, Agudelo Gómez, Divier Antonio.** *Composición nutricional de la leche de ganado vacuno.* 1, Antioquia : s.n., 2005, Vol. 2.
9. **Díz, María.** *El queso al desnudo..* Málaga : s.n., 2011.
10. **José Ramirez, Petra Ulloa, Martha Velázquez, Jose Ulloa, Francisco Romero.** *Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud.* 7, México : s.n., 2011.
11. **Huertas, Ricardo Adolfo Parra.** *Bacterias ácido laticas; papel funcional en los alimentos.* 1, Tunja : s.n., 2010, Vol. 8.
12. **Hernández, Alicia.** *Microbiología industrial.* San José : EUNED, 2003. pág. 202.
13. **Baquerizo, Mariuxi Jessenia Goya.** *Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación.* Quevedo : s.n., 2013.
14. **Peña, Diana Lucila Luzuriaga.** *Extracción y aprovechamiento del mucílago de cacao (Theobroma cacao) Como materia prima en la elaboración de vino .* Quito : s.n., 2012.
15. **Hernandez, Alicia.** *Microbiología Industrial.* [ed.] EUNED.
16. **Ramírez López, Vélez Ruiz.** *Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad.* Puebla : s.n., 2012.

17. **Muñoz, Miriam.** *Los alimentos y sus nutrientes. Tablas de valor nutritivo de alimentos.* México : s.n., 2002.
18. **INEN.** *Requisitos para quesos frescos no madurados, requisitos.* Quito : s.n., 2012.
19. **Buendía Monreal Manuel, González Rodríguez Vanessa, Mendoza Márquez Ana M., Muñoz Hernández J. Enrique y Reyes Díaz C. Alejandra .** *Queso fresco .* México : s.n., 2003.
20. **Martín del Campo M, Héctor E. Gómez H y Ricardo Alaníz de la O.** *Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos.* Guadalajara : e-Gnosis, 2008, Vol. 6, pág. 17.
21. **PhD, Kenneth Todar.** *Online Textbook of Bacteriology.* [En línea] [Citado el: Sabado de Abril de 2017.] http://textbookofbacteriology.net/featured_microbe.html.
22. **Morales J, Jorge de Jesús, García J, Adriana y Enrique, Méndez B.** *¿Qué sabe usted acerca de...Cacao?* 4, México : Asociación farmacéutica mexicana, A.C., 2012, Vol. 43, págs. 79-81.
23. **Inversiones, Instituto de Promoción de Exportaciones e.** Cacao y Elaborados. *PRO ECUADOR - Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones.* [En línea] [Citado el: 18 de Julio de 2016.] <http://www.proecuador.gob.ec/>.
24. **Alma Rangel Fajardo, Hilda A. Zavaleta Mancera, Leobigildo Córdova Téllez, Alejandro P.López Andrade, Adriana Delgado Alvarado, Ignacio Vidales Fernández, y Ángel Villegas Monter.** *anatomía e histoquímica de la semilla del cacao (Theobroma cacao L.) criollo mexicano.* 3, México : s.n., 2012, Vol. 35.
25. **Yugcha, Shirley y Largo Johanna.** *Elaboración de Néctar natural de cacao a partir del mucílago.* Guayaquil : s.n., 2016.
26. **Pérez, P.** *Mucílago de Cacao.* 2004. pág. 7.
27. **Kalvatchev, Z., Garzaro, D. & Guerra, F.** *Un nuevo enfoque para nutrición y salud.* 1998, pág. 24.
28. **Jaimes, Gonzáles y.** *Desarrollo experimental del proceso para la obtención de jugo derivado del mucilago de cacao.* 2005.
29. **Anvoh, Zoro & López.** *Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and its transformation into.* Pakistan : s.n., 2009.
30. **Roberto, Marroquín Peña.** *Metodología de la investigación.* Lima : s.n., 2012, Vol. 4.
31. **Juan Chen, Jing Shen, Lars Ingvar Hellgren , Peter Ruhdal Jensen y Christian Solem.** *La adaptación de Lactococcus lactis a alta temperatura de crecimiento conduce a un aumento espectacular de la tasa de acidificación.* Dinamarca : s.n., 2015.
32. **Romero Castillo, Leyva Ruelas, Cruz Castillo y Santos Moreno.** *Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical mexicano de la región de tonalá, chiapas.* 1, México : s.n., 2009, Vol. 8.

33. **Ingrid Bain.** *Etapas del proceso de elaboración de quesos* . 1, Chubut : s.n., 2014.
34. **Reyes, Heidi Michell Molina.** *Evaluación de factores que afectan el rendimiento del queso crema y zamorella en la planta de lácteos de la EAP.* San Antonio de Oriente : s.n., 2014.
35. **Pedro, María Del Carmen.** *Evaluación del contenido de calcio y fósforo en quesos blandos comerciales. Estudio de parámetros tecnológicos que definen la concentración de los mismos en el queso.* Santa fe : s.n., 2013.
36. **Villareal, Manuel González.** *Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo y yogurt.* Veraguas : s.n., 2002.
37. **Francia Elena Valencia García, Leonidas de Jesús Millán Cardona y Yamilé Jaramillo Garcés.** *Estimación de la vida útil fisicoquímica, sensorial e instrumental de queso crema bajo en calorías.* 1, Antioquia : s.n., 2008, Vol. 5.
38. **Eliana, Parra Ricardo y Fonseca.** *Características fisicoquímica, proximal y sensorial de un queso tipo crema.* 1, Medellín : s.n., 2012, Vol. 19.
39. **Andrea C. Castro, Carlos F. Novoa, Nestor Algecira y Gustavo Buitrago.** *Reología y textura de quesos bajos en grasa.* 22, Bogota : s.n., 2014.
40. **Ramos L, Gallardo Y, Ortega O, Del Real E y Paz T.** *Elaboración de queso crema probiótico (L. casei), bajo en grasa, adicionado con inulina y saborizado.* México : s.n., 2005.
41. **Toqeer Ahmed, Rashida Kanwal y Najma Ayub.** *Influencia de la temperatura en el patrón de crecimiento de Lactococcus lactis, Streptococcus cremoris y Lactobacillus acidophilus aislada a partir de camel milk.* 2006, Science Alert.
42. **Ramos Izquierdo, Bucio Galindo, Bautista Muñoz, Aranda Ibáñez, Izquierdo Reyes.** *Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical.* 2, Villahermosa : s.n., 2009, Vol. 25.
43. **Carola Íñiguez, Florencio Cardoso y Vladimir Suárez.** *Conservación de un queso tipo crema de alta humedad a partir de leche de búfala.* 3, La Habana : s.n., 2008, Vol. 18.
44. **Muñoz, Miriam.** *Los alimentos y sus nutrientes.* México : s.n., 2002.
45. **Clemente Granados Conde, Rafael González Cuello, Wendy Galindo, Daniela Pérez, Nerlis Pájaro Castro.** *Obtención de queso crema con propiedades funcionales suplementado con sólidos de lactosuero e inoculado con Lactobacillus casei.* 2, Villavicencio : s.n., 2016, Vol. 20.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexo 1. ANDEVA de los análisis bromatológicos: humedad, cenizas, proteínas, grasas y pH.

- **Humedad.**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	205,4586347	102,7293173	838,40	<.0001
Error	9	1,1027723	0,1225303		
Total corregido	11	206,5614069			

Elaborado por: Autor.

- **Cenizas.**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0,01469267	0,00734633	2,81	0,1124
Error	9	0,02349800	0,00261089		
Total corregido	11	0,03819067			

Elaborado por: Autor.

- **Humedad.**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	13,54542867	6,77271433	374,94	<.0001
Error	9	0,16257225	0,01806358		
Total corregido	11	13,70800092			

Elaborado por: Autor.

- **Grasa.**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0,04666667	0,02333333	0,48	0,6353
Error	9	0,44000000	0,04888889		
Total corregido	11	0,48666667			

Elaborado por: Autor.

- pH.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0,25205000	0,12602500	132,27	<.0001
Error	9	0,00857500	0,00095278		
Total corregido	11	0,26062500			

Elaborado por: Autor.

Anexo 2. ANDEVA de los análisis organolépticos: acidez, sabor, textura y olor.

- Acidez.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	8,04444444	4,02222222	4,57	0,0160
Error	42	36,93333333	0,87936508		
Total corregido	44	44,97777778			

Elaborado por: Autor.

- Sabor.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	9,64444444	4,82222222	10,70	0,0002
Error	42	18,93333333	0,45079365		
Total corregido	44	28,57777778			

Elaborado por: Autor.

- Textura.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	4,13333333	2,06666667	3,76	0,0314
Error	42	23,06666667	0,54920635		
Total corregido	44	27,20000000			

Elaborado por: Autor.

- Olor.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	9,644444444	4,822222222	10,06	0,0003
Error	42	20,13333333	0,47936508		
Total corregido	44	29,77777778			

Elaborado por: Autor.

Anexo 3. Técnica de determinación de proteína bruta.

Se realizó con la norma del laboratorio de bromatología. Para el proceso de la digestión se pesa aproximadamente 0,3 g de muestra sobre un papel exento de nitrógeno y se coloca en el tubo digestor. Se adiciona una tableta catalizadora y 10 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se enciende el digestor y son colocados los tapones. El digestor es encendido y calibrado a 420 ° y se deja la muestra hasta su clarificación (color verde claro). Se deja enfriar a temperatura ambiente.

Para el proceso de la titulación es necesario que en cada tubo se adicione 35 ml de agua destilada. Se coloca el tubo y el matraz de recepción con 250 ml de ácido bórico al 2 % en el sistema Kjeltex. Se enciende el sistema y se adiciona 50 ml de hidróxido de sodio al 40 %, teniendo cuidado de que exista un flujo normal de agua. Se recoge aproximadamente 200 ml de destilado y se retira del sistema los accesorios y se apaga.

Para el proceso de titulación del destilado recogido en el matraz se coloca tres gotas de indicador. Se titula con ácido clorhídrico al 0,1 N utilizando un agitador mecánico. Se registra el volumen de ácido consumido y finalmente se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \frac{(VHCl - Vb) * 1,401 * NHCl * F}{g \text{ de muestra}}$$

Dónde:

1,401 = Peso atómico del nitrógeno.

NHCl = Normalidad de ácido clorhídrico al 0,1N.

F = Factor de conversión (6,25).

VHCl = Volumen del ácido clorhídrico consumido en la titulación.

Vb = Volumen del blanco (0,1).

Anexo 4. *Técnica de determinación de humedad o pérdida por calentamiento.*

Se realizó con la norma del laboratorio de bromatología. Para ello debe realizarse por duplicado, calentando el crisol de porcelana durante 30 minutos en la estufa en donde va hacer colocada la muestra y se deja enfriar a temperatura ambiente, y posteriormente se registra el peso. Se homogeniza la muestra y se pesa 2 g con aproximación al 0,1 mg en la balanza analítica. Se lleva a la estufa con regulador de temperatura a 130 °C por el lapso de 2 horas. Transcurrido el tiempo se los retira del equipo y se deja enfriar en el desecador por 30 minutos para registrar el peso. Finalmente se aplica la siguiente fórmula:

$$\textbf{Humedad} (\%) = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

Dónde:

W₀ = Peso de la muestra en gramos.

W₁ = Peso del crisol más la muestra después del secado en gramos.

W₂ = Peso del crisol más la muestra antes del secado en gramos.

La diferencia entre el 100 % y el valor obtenido del análisis de humedad, permite conocer el contenido de la materia seca, lo cual se determina con la siguiente operación matemática.

$$\textbf{Materia seca o sólidos totales} (\%) = 100 - \textbf{Humedad} (\%)$$

Anexo 5. *Técnica de determinación de grasa en quesos.*

Este método se basa en la digestión parcial de los componentes del queso, excepto la grasa, en ácido sulfúrico. Emplea alcohol isoamílico para ayudar a disminuir la tensión en la interfase entre la grasa y la mezcla en reacción (ácido sulfúrico-leche), lo que facilita el ascenso de los glóbulos pequeños de grasa por centrifugación. El alcohol isoamílico reacciona con el ácido sulfúrico formando un éster que es completamente soluble en dicho

ácido. Se pesa directamente en la copa fijada en el tapón del butirómetro $3 \text{ g} \pm 0.001 \text{ g}$ de queso y se mete la copa con la muestra de queso dentro del butirómetro, por la abertura superior, agregar el butirómetro 10 cm^3 de ácido sulfúrico de tal manera que recubra todo el queso. Se tapa la abertura y se coloca en baño maría a $338 \pm 65^\circ\text{C}$ por 30 minutos, agitar cuidadosamente 2 o 3 veces durante ese lapso, para disolver todas las partículas de queso, se agrega 1 cm^3 de alcohol isoamílico o amílico y se agita. Se termina de llenar el butirómetro con ácido sulfúrico, hasta que el volumen llegue aproximadamente tres cuartas partes de la columna graduada, luego se Tapa la abertura superior y se vuelve a meter al baño maría por 5 minutos. Posteriormente se mezcla antes de centrifugar a 1,200 r.p.m., durante 5 minutos, se vuelve a meter el butirómetro al baño maría y se deja ahí 10 minutos, se realiza la lectura llevando la base de la columna de grasa exactamente al cero, por medio de presión en el tapón del butirómetro.

La lectura observada en la escala indica directamente la cantidad en porciento de la grasa contenida en el queso.

Anexo 6. Técnica de determinación de cenizas o materia inorgánica.

Se realiza con la norma del Laboratorio de Bromatología. Para ello la determinación debe efectuarse por duplicado. Se calienta el crisol de porcelana durante 30 minutos en la estufa, en donde va hacer colocada la muestra y se deja enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se registra el peso. La muestra se homogeniza y se pesa 1 g con aproximación al $0,1 \text{ mg}$ en una balanza analítica. Se lleva a la mufla a 600°C por 3 horas. Transcurrido el tiempo se saca y se deja enfriar en el desecador por 30 minutos y se registra el peso, para finalmente aplicar la siguiente fórmula.

$$\text{Cenizas o materia inorgánica (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

Dónde:

W_0 = Peso de la muestra en gramos.

W_1 = Peso del crisol vacío en gramos.

W_2 = Peso del crisol más la muestra calcinada en gramos.

La diferencia entre el 100 % y el valor obtenido del análisis de cenizas o materia inorgánica, permite conocer el contenido de la materia orgánica, lo cual se determina con la siguiente operación matemática.

$$\textbf{Materia orgánica (\%)} = 100 - \text{Cenizas (\%)}$$

Anexo 7. Análisis sensorial afectivo cuantitativo del queso crema.

Por favor, lea detenidamente las escalas y califique con un visto según su criterio del 1 al 5, siendo el 5 la característica más óptima del queso crema.

Nombre de la muestra: _____

TEXTURA

1	2	3	4	5
Duro	Semi duro	Ligeramente suave	Suave	Muy suave

OLOR

1	2	3	4	5
Muy desagradable	Desagradable	Ligeramente Agradable	Agradable	Muy agradable

SABOR

1	2	3	4	5
Muy ácido	Ácido	Ligeramente ácido	Acidez agradable	Acidez muy agradable

1	2	3	4	5
Muy desagradable	Desagradable	Ligeramente Agradable	Agradable	Muy agradable

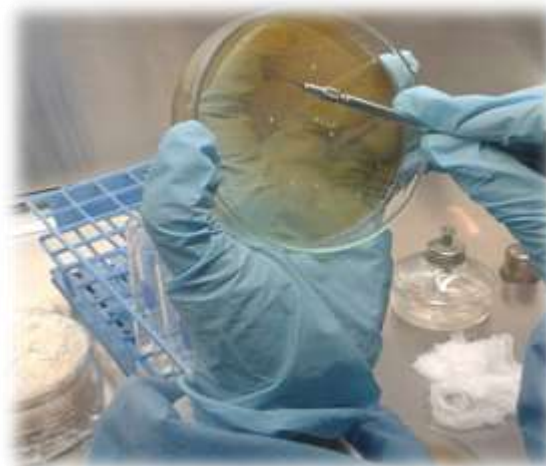
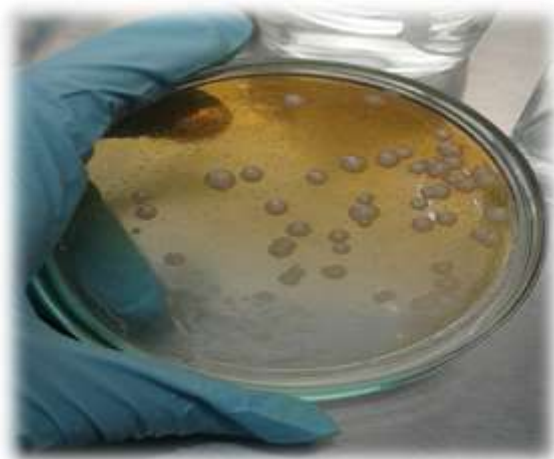
¡Muchas gracias por su colaboración!

Anexo 8. Fotos del experimento.

Mucílago de cacao fino de aroma.



Obtención de bacterias *Lactococcus* spp.



Proceso de disolución de las bacterias en leche.



Se agregaron 5 mL de leche en cada tubo de ensayo y se disolvieron las bacterias.



Las bacterias disueltas en los 5 mL fueron agregados a 500 mL de leche



Incubación de los quesos crema y ajuste de las diferentes temperaturas.



Desuerado del queso crema y pesado.



Agregación de sal y almacenamiento de los quesos crema



Análisis microbiológico de los quesos crema.



Análisis sensorial de los quesos crema.



Determinación de humedad o pérdida por calentamiento.



Determinación de materia inorgánica o cenizas.



Determinación de proteína.



Determinación de pH.



Determinación de grasa.



Anexo 9. Balance de masa y humedad del queso crema.

